



Selai buah



© BSN 2008

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Mangala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Komposisi	1
4 Syarat mutu.....	1
5 Pengambilan contoh	2
6 Cara uji	2
7 Syarat lulus uji.....	2
8 Higiene.....	2
9 Pengemasan.....	3
10 Penandaan	3
Lampiran A (normatif) Metode pengambilan contoh selai buah	4
Lampiran B (normatif) Cara uji selai buah	8
Bibliografi	26
Gambar B.1 - Metoda pengenceran	18
Tabel 1 - Syarat mutu selai buah.....	1
Tabel A.2 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 1 kg tapi tidak lebih dari 4.5 kg.....	6
Tabel A.3 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 4,5 kg.....	6
Tabel A.4 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih sama atau kurang dari 1 kg	6
Tabel A.5 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 1 kg (2,2 lb) tapi tidak lebih dari 4,5 kg	6
Tabel A.6 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 4,5 kg.....	7
Tabel B.1 - Koreksi pembacaan refraktometer dengan skala indikasi sukrosa untuk perbedaan suhu $20^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	11
Tabel B.2 - Hubungan antara indeks bias dan % padatan terlarut (sukrosa).....	12

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) ini merupakan revisi SNI 01-3746-1995, *Selai buah*.

Tujuan penyusunan standar ini adalah:

- Melindungi kesehatan konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Diversifikasi produk/pengembangan produk;
- Mendukung perkembangan industri selai buah.

Rumusan standar ini telah memperhatikan hal-hal yang tertera dalam:

1. Undang-undang RI No. 7 tahun 1996 tentang Pangan;
2. Peraturan Pemerintah No. 69 tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.

Standar ini disusun oleh Panitia Teknis 67-04 Makanan dan Minuman dan telah dibahas dalam rapat konsensus lingkup Panitia Teknis pada tanggal 31 Januari 2007 di Jakarta. Hadir dalam rapat konsensus anggota Panitia Teknis dan wakil produsen, konsumen, lembaga pengujian, Lembaga IPTEK dan instansi terkait lainnya,

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada bulan 29 Agustus 2007 sampai dengan bulan 29 November 2007 dan langsung disetujui menjadi RASNI



Selai buah

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan syarat mutu, pengambilan contoh dan cara uji selai buah.

2 Istilah dan definisi

selai buah

produk makanan semi basah yang dapat dioleskan yang dibuat dari pengolahan buah-buahan, gula dengan atau tanpa penambahan bahan pangan lain dan bahan tambahan pangan yang diijinkan

3 Komposisi

3.1 Bahan baku utama

Buah-buahan (segar, beku, dalam kaleng, bubur buah, *puree*, konsentrat) dan gula

3.2 Bahan tambahan pangan

Bahan tambahan pangan yang diijinkan dapat ditambahkan pada produk selai buah sesuai dengan peraturan yang berlaku

4 Syarat mutu

Syarat mutu selai buah sesuai Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 - Syarat mutu selai buah

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Aroma	-	Normal
1.2	Warna	-	Normal
1.3	Rasa	-	Normal
2	Serat buah	-	Positif
3	Padatan terlarut	% fraksi massa	Min. 65
4	Cemaran logam		
4.1	Timah (Sn)*	mg/kg	Maks. 250,0*
5	Cemaran Arsen (As)	mg/kg	Maks. 1,0

Tabel 1 (lanjutan)

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
6	Cemaran mikroba		
6.1	Angka lempeng total	Koloni/g	Maks. 1×10^3
6.2	Bakteri <i>coliform</i>	APM/g	<3
6.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	Koloni/g	Maks. 2×10^1
6.4	<i>Clostridium sp.</i>	Koloni/g	<10
6.5	Kapang/Khamir	Koloni/g	Maks. 5×10^1
*) Dikemas dalam kaleng			

5 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh seperti tercantum pada Lampiran A.

6 Cara uji

Cara uji syarat mutu selai buah seperti di bawah ini:

- 1 Persiapan contoh seperti pada Lampiran B.1
- 2 Cara uji keadaan seperti pada Lampiran B.2
 - 2.1 Cara uji aroma seperti pada Lampiran B.2.1
 - 2.2 Cara uji warna seperti pada Lampiran B.2.2
 - 2.3 Cara uji rasa seperti pada Lampiran B.2.3
- 3 Cara uji serat buah (secara visual) seperti pada Lampiran B.3
- 4 Cara uji padatan terlarut seperti pada Lampiran B.4
- 5 Cara uji cemaran logam seperti pada Lampiran B.5
 - 5.1 Cara uji timah (Sn) seperti pada Lampiran B.5.2
- 6 Cara uji arsen (As) seperti pada Lampiran B.6
- 7 Cara uji cemaran mikroba seperti pada Lampiran B.7
 - 7.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji angka lempeng total, bakteri *coliform*, kapang/khamir seperti pada Lampiran B.7.1
 - 7.2 Cara uji angka lempeng total (metode *plate count*) seperti pada Lampiran B.7.2
 - 7.3 Cara uji bakteri *coliform* seperti pada Lampiran B.7.3
 - 7.4 Cara uji *Staphylococcus aureus* seperti pada Lampiran B.7.4
 - 7.5 Cara uji *Clostridium sp.* seperti pada Lampiran B.7.5
 - 7.6 Cara uji kapang/khamir seperti pada Lampiran B.7.6

7 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Pasal 4.

8 Higiene

Cara memproduksi selai buah yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya mengacu pada peraturan tentang Pedoman Cara Produksi Pangan yang Baik.

9 Pengemasan

Selai buah dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

10 Penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan peraturan tentang label dan iklan pangan.



Lampiran A (normatif) Cara pengambilan contoh selai buah

A.1 Prinsip

Pengambilan contoh selai buah yang dikemas dengan cara melihat banyaknya unit contoh yang cacat pada AQL (*Acceptance Quality Level*) 6,5 dan contoh diambil secara acak.

A.2 Penerapan pengambilan contoh

A.2.1 Informasi yang diperlukan

Dalam menggunakan rancangan pengambilan contoh dalam Lampiran A.1 diperlukan beberapa informasi sebagai berikut:

- a) Tingkat inspeksi;
- b) Ukuran lot (N);
- c) Ukuran kemasan terkecil (berat bersih dalam g);
- d) Ketentuan standar mengenai kualitas produk yang dikehendaki, misalkan penggolongan cacat dan jumlah cacat yang diperbolehkan dari sejumlah lot yang diperiksa.

A.2.2 Inspeksi

- a) Pemilihan tingkat inspeksi berdasarkan:
tingkat inspeksi I, digunakan untuk pengambilan contoh normal (biasa).
tingkat inspeksi II, digunakan untuk pengambilan contoh bila terjadi sanggahan terhadap hasil pengujian menurut tingkat inspeksi I, atau bila diperlukan hasil pengujian yang lebih menyakinkan.
- b) Tentukan ukuran lot (N), misalkan jumlah kemasan terkecil selai buah;
- c) Tentukan ukuran contoh (n) yang akan diambil dari suatu lot yang diperiksa, yang didasarkan pada ukuran lot, ukuran kemasan terkecil, dan tingkat inspeksi. Penentuan ukuran contoh dapat dilihat pada Lampiran A.1.;
- d) Ambil secara acak sejumlah ukuran contoh (n) yang diperlukan dari lot;
- e) Uji produk berdasarkan standar. Identifikasi setiap kemasan atau unit contoh yang tidak memenuhi spesifikasi yang terdapat dalam persyaratan standar dan dinyatakan cacat berdasarkan penggolongan cacat yang terdapat dalam standar;
- f) Gunakan rancangan pengambilan contoh pada Lampiran A;
- g) Nyatakan bahwa lot diterima jika cacat sama atau kurang dari jumlah cacat yang diperbolehkan (c) dan lot ditolak jika cacat melebihi jumlah cacat yang diperbolehkan (c).

A.2.3 Penerapan rancangan pengambilan contoh

A.2.3.1 Tingkat inspeksi I

Misalkan lot terdiri dari 1200 karton, setiap karton berisi 12 kemasan, masing-masing kemasan berukuran 1000 g. Keputusan diambil menggunakan Tingkat Inspeksi I jika produk tersebut belum pernah diuji dan belum pernah mendapat sanggahan mengenai kualitasnya.

- a) Ukuran lot (N) : 1.200 x 12 atau 14.400 unit
- b) Ukuran kemasan : 400 g
- c) Tingkat inspeksi : I (lihat rancangan pengambilan contoh 1, lampiran A.3.1)
- d) Ukuran contoh (n) : 13
- e) Jumlah maksimum cacat yang diterima (c) : 2

Lot diterima apabila jumlah cacat yang ditemukan dari 13 contoh yang diuji sama atau kurang dari 2 dan lot ditolak apabila jumlah cacat yang ditemukan dari 13 kemasan yang diuji lebih besar dari 2.

A.2.3.2 Tingkat inspeksi II

Bila hasil pengujian pertama mendapat sanggahan (A.2.3.1) maka harus dilakukan pemeriksaan ulangan terhadap lot tersebut dengan ukuran contoh yang lebih banyak sesuai dengan tingkat inspeksi II.

- a) Ukuran lot (N) : 1.200 x 12 atau 14.400 unit
- b) Ukuran kemasan : 400 g
- c) Tingkat inspeksi : II (lihat rancangan pengambilan contoh 2, lampiran A.3.2)
- d) Ukuran contoh (n) : 21
- e) Jumlah maksimum cacat yang diterima (c) : 3

A.2.4 Catatan mengenai ukuran contoh

Tidak perlu membatasi ukuran contoh sebagai minimum untuk ukuran lot dan tingkat inspeksi yang tepat. Dalam semua kasus, contoh yang lebih besar dapat dipilih. Dalam contoh A.2.3.2 perkiraan yang lebih dipercaya mengenai mutu lot dapat dibuat dengan mengambil contoh sebanyak 29 atau 48 dan menggunakan jumlah ketentuan, yang diterima berturut-turut sebanyak 4 dan 6.

A.3 Rancangan pengambilan contoh

A.3.1 Rancangan pengambilan contoh 1 (Tingkat inspeksi I, AQL = 6,5)

Tabel A.1 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih sama atau kurang dari 1 kg

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
4.800 atau kurang	6	1
4.801 – 24.000	13	2
24.001 – 48.000	21	3
48.001 – 84.000	29	4
84.001 – 144.000	48	6
144.001 – 240.000	84	9
Lebih dari 240.000	126	13

**Tabel A.2 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 1 kg
tapi tidak lebih dari 4,5 kg**

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
2.400 atau kurang	6	1
2.401 – 15.000	13	2
15.001 – 24.000	21	3
24.001 – 42.000	29	4
42.001 – 72.000	48	6
72.001 – 120.000	84	9
Lebih dari 120.000	126	13

Tabel A.3 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 4,5 kg

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
600 atau kurang	6	1
601 – 2.000	13	2
2.001 – 7.200	21	3
7.201 – 15.000	29	4
15.001 – 24.000	48	6
24.001 – 42.000	84	9
Lebih dari 42.000	126	13

A.3.2 Rancangan pengambilan contoh 2 (Tingkat inspeksi II, AQL = 6,5)

Tabel A.4 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih sama atau kurang dari 1 kg

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
4.800 atau kurang	13	2
4.801 – 24.000	21	3
24.001 – 48.000	29	4
48.001 – 84.000	48	6
84.001 – 144.000	84	9
144.001 – 240.000	126	13
Lebih dari 240.000	200	19

**Tabel A.5 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 1 kg (2,2 lb)
tapi tidak lebih dari 4,5 kg**

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
2.400 atau kurang	13	2
2.401 – 15.000	21	3
15.001 – 24.000	29	4
24.001 – 42.000	48	6
42.001 – 72.000	84	9
72.001 – 120.000	126	13
Lebih dari 120.000	200	19

Tabel A.6 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 4,5 kg

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
600 atau kurang	13	2
601 – 2.000	21	3
2.001 – 7.200	29	4
7.201 – 15.000	48	6
15.001 – 24.000	84	9
24.001 – 42.000	126	13
Lebih dari 42.000	200	19



Lampiran B
(normatif)
Cara uji selai buah

B.1 Persiapan contoh

Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan analisis kimia. Pengambilan contoh diupayakan dari kemasan yang sama.

B.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi

Buka kemasan selai buah dan ambil contoh selai buah minimum 100 g secara aseptik dengan menggunakan sendok steril kemudian tempatkan dalam botol contoh.

B.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik dan analisis kimia

Buka kemasan selai buah dan ambil contoh selai buah minimum 300 g secara hati-hati dengan menggunakan sendok yang bersih dan kering kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering. Jika ukuran kemasan kurang dari 300 g maka ambil beberapa kemasan sehingga selai buah menjadi 300 g.

B.2 Keadaan**B.2.1 Aroma****B.2.1.1 Prinsip**

Melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera penciuman (hidung).

B.2.1.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji kira-kira 10 g dan letakkan diatas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) Cium contoh uji untuk mengetahui baunya;
- c) Lakukan pengerjaan oleh minimal 3 orang panelis.

B.2.1.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tercium bau khas selai buah maka hasil dinyatakan "normal";
- b) Jika tercium bau asing selain bau khas selai buah maka hasil dinyatakan "tidak normal".

B.2.2 Warna**B.2.2.1 Prinsip**

Melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera penglihatan (mata).

B.2.2.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji kira-kira 10 g contoh uji dan letakkan diatas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) Amati contoh uji untuk mengetahui warnanya;
- c) Lakukan pengerjaan oleh minimal 3 orang panelis.

B.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika terlihat warna khas selai buah maka hasil dinyatakan "normal";
- b) Jika terlihat warna selain warna khas selai buah maka hasil dinyatakan "tidak normal".

B.2.3 Rasa**B.2.3.1 Prinsip**

Melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera perasa (lidah).

B.2.3.2 Cara kerja

- a) Ambil kira-kira 1/2 sendok contoh uji dan rasakan dengan lidah;
- b) Lakukan pengerjaan oleh minimal 3 orang panelis.

B.2.3.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika terasa khas selai buah maka hasil dinyatakan "normal";
- b) Jika terasa rasa asing selain rasa khas selai buah maka hasil dinyatakan "tidak normal".

B.3 Serat buah (secara visual)**B.3.1 Prinsip**

Penetapan serat buah berdasarkan pengamatan secara visual menggunakan penglihatan (mata).

B.3.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh secukupnya, oleskan pada kaca obyek atau ditekan di antara dua kaca obyek;
- b) Amati apakah terdapat serat buah.

B.3.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika terlihat serat buah maka hasil dinyatakan "positif";
- b) Jika tidak terlihat serat buah maka hasil dinyatakan "negatif".

B.4 Padatan terlarut

B.4.1 Prinsip

Indeks bias larutan contoh diukur pada suhu $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ menggunakan refraktometer. Nilai indeks bias setara dengan jumlah padatan terlarut (dihitung sebagai konsentrasi sukrosa) menggunakan Tabel B.2 (Hubungan antara indeks bias dan % padatan terlarut), atau langsung dibaca pada refraktometer yang mempunyai skala nilai padatan terlarut.

B.4.2 Pereaksi

- Air

Air yang digunakan harus disuling dua kali dalam alat gelas borosilikat, atau yang setara dengan kemurniannya.

B.4.3 Peralatan

- a) Refraktometer
Dapat menggunakan salah satu dari alat berikut ini :
 - a.1 Refraktometer yang menunjukkan indeks bias dengan skala 0,001 agar mampu membaca hingga kira-kira 0,0002. Refraktometer ini diatur agar indeks bias pada suhu $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ untuk air suling menunjukkan nilai 1,3330.
 - a.2 Refraktometer yang menunjukkan nilai sukrosa dengan skala 0,10 %. Refraktometer ini diatur agar nilai padatan terlarut (sukrosa) air suling menunjukkan nilai 0.
- b) Alat untuk sirkulasi air, alat ini berguna untuk mempertahankan suhu pada prisma refraktometer tetap stabil sekitar $\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ agar nilai perbedaan suhu selain $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ dapat dihitung menggunakan Tabel koreksi.
- c) Gelas piala 250 ml.

B.4.4 Cara kerja

- a) Timbang dengan teliti hingga 40 g contoh ke dalam gelas piala dan tambahkan 100 ml sampai 150 ml air. Panaskan hingga mendidih selama 2 menit sampai 3 menit, aduk dan dinginkan. Biarkan 20 menit lalu timbang dan di saring.
- b) Pastikan peralatan telah dipersiapkan dan diteliti menurut buku panduan alat dan bersihkan permukaan prisma lalu keringkan.
- c) Alirkan air pengontrol untuk mendapatkan suhu yang diharapkan (antara $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan $25\text{ }^{\circ}\text{C}$), biarkan air mengalir melalui mantel prisma refraktometer pada jangka waktu tertentu supaya terjadi keseimbangan suhu ± 5 menit (prisma dalam keadaan tertutup).
- d) Pindahkan satu tetes air ke prisma refraktometer untuk menentukan titik nol atau digunakan sebagai koreksi.
- e) Ambil larutan contoh dan atur suhu yang diinginkan. Teteskan (2 tetes sampai 3 tetes) larutan contoh kedalam prisma refraktometer, buat larutan menyebar ke permukaan prisma dan segera atur tombol untuk mengatur prisma. Penggunaan lampu uap natrium akan mendapatkan hasil yang lebih tepat (khususnya untuk produk yang berwarna/gelap).
- f) Baca refraktometer sesuai petunjuk buku panduan alat.
- g) Gunakan beberapa skala koreksi untuk mendapatkan pembacaan terkoreksi.

CATATAN Apabila dikerjakan pada suhu selain $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ maka pembacaan harus dikoreksi dengan Tabel koreksi pada Tabel B.1

B.4.5 Penyajian hasil uji

B.4.5.1 Koreksi

Jika dibaca pada suhu selain dari $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ maka koreksinya menggunakan rumus sebagai berikut :

- a) Untuk refraktometer yang menggunakan skala indeks bias digunakan rumus :

$$n_D^{20} = n_D^t + 0,0013(t - 20)$$

dengan:

n_D^{20} adalah indeks bias pada suhu $20\text{ }^{\circ}\text{C}$;

n_D^t adalah indeks bias pada suhu pengukuran;

t adalah suhu dalam $^{\circ}\text{C}$.

- b) Untuk refraktometer yang menggunakan skala % sukrosa, koreksi hasil dengan menggunakan Tabel B.1

B.4.6 Perhitungan

- a) Refraktometer dengan skala indeks bias :

Baca padatan terlarut dari Tabel B.2 , koreksi jika perlu.

$$\% \text{ padatan terlarut} = \frac{(P \times m_1)}{m_0}$$

dengan :

P adalah padatan terlarut yang diencerkan (%);

m_0 adalah bobot contoh sebelum dilarutkan (g);

m_1 adalah bobot contoh setelah dilarutkan (g).

- b) Refraktometer dengan skala nilai sukrosa

Hitung % padatan terlarut menggunakan rumus pada B.4.5.2.a.

B.4.6.7 Ketelitian

Perbedaan hasil antara dua penetapan tidak boleh lebih dari 5 % untuk produk yang mengandung padatan terlarut lebih besar dari 0,5 %

Tabel B.1 - Koreksi pembacaan refraktometer dengan skala indikasi sukrosa untuk perbedaan suhu $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$

Suhu ($^{\circ}\text{C}$)	Pembacaan skala untuk padatan terlarut, % (berdasar massa)									
	5	10	15	20	25	30	40	50	60	70
	Koreksi untuk dikurang									
15	0,29	0,31	0,33	0,34	0,34	0,35	0,37	0,38	0,39	0,40
16	0,24	0,25	0,26	0,27	0,28	0,28	0,30	0,30	0,31	0,32
17	0,18	0,19	0,20	0,21	0,21	0,21	0,22	0,23	0,23	0,24
18	0,13	0,13	0,14	0,14	0,14	0,14	0,15	0,15	0,16	0,16
19	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08

Tabel B.1 (lanjutan)

Suhu (°C)	Pembacaan skala untuk padatan terlarut, % (berdasar massa)									
	5	10	15	20	25	30	40	50	60	70
	Koreksi untuk ditambah									
21	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
22	0,13	0,14	0,14	0,15	0,15	0,15	0,15	0,16	0,16	0,16
23	0,20	0,21	0,22	0,22	0,23	0,23	0,23	0,24	0,24	0,24
24	0,27	0,28	0,29	0,30	0,30	0,31	0,31	0,31	0,32	0,32
25	0,35	0,36	0,37	0,38	0,38	0,39	0,40	0,40	0,40	0,40

Tabel B.2 - Hubungan antara indeks bias dan % padatan terlarut (sukrosa)

Indeks bias n_D^{20}	Padatan terlarut (sukrosa) % (massa)	Indeks bias n_D^{20}	Padatan terlarut (sukrosa) % (massa)	Indeks bias n_D^{20}	Padatan terlarut (sukrosa) % (massa)	Indeks bias n_D^{20}	Padatan terlarut (sukrosa) % (massa)
1,3330	0	1,3672	22	1,4076	44	1,4558	66
1,3344	1	1,3689	23	1,4096	45	1,4582	67
1,3359	2	1,3706	24	1,4117	46		
1,3373	3	1,3723	25	1,4137	47	1,4606	68
1,3388	4	1,3740	26			1,4630	69
1,3403	5	1,3758	27	1,4158	48	1,4654	70
				1,4179	49		
1,3418	6	1,3775	28	1,4201	50	1,4679	71
1,3433	7	1,3793	29	1,4222	51	1,4703	72
1,3448	8	1,3811	30	1,4243	52	1,4728	73
1,3463	9	1,3829	31			1,4753	74
1,3478	10	1,3847	32	1,4265	53	1,4778	75
				1,4286	54		
1,3494	11	1,3865	33	1,4308	55	1,4803	76
1,3509	12	1,3883	34	1,4330	56	1,4829	77
1,3525	13	1,3902	35	1,4352	57	1,4854	78
1,3541	14	1,3920	36			1,4880	79
1,3557	15	1,3939	37	1,4374	58	1,4906	80
				1,4397	59		
1,3573	16	1,3958	38	1,4419	60	1,4933	81
1,3589	17	1,3978	39	1,4442	61	1,4959	82
1,3605	18	1,3997	40	1,4465	62	1,4985	83
1,3622	19	1,4016	41			1,5012	84
1,3638	20	1,4036	42	1,4488	63	1,5039	85
				1,4511	64		
1,3655	21	1,4056	43	1,4535	65		

B.5 Cemaran logam

B.5.1 Penetapan timah (Sn)

B.5.1.1 Prinsip

Contoh didekstruksi dengan HNO_3 dan HCl kemudian ditambahkan KCl untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan spektrofotometer serapan atom pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$.

B.5.1.2 Pereaksi

- Larutan kalium klorida, 10 mg/ml K;
larutkan 1,91 g KCl dengan air menjadi 100 ml.
- Asam nitrat pekat, HNO_3 pekat;
- Asam klorida pekat, HCl pekat;
- Larutan baku 1000 mg/l Sn;
larutkan 1,000 g Sn dengan 200 ml asam HCl pekat dalam labu ukur 1000 ml, tambahkan 200 ml air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan baku kerja Sn.
pipet 10 ml HCl pekat dan 1,0 ml larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 ml. Tambahkan masing-masing 0 ml; 0,5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml dan 2,5 ml larutan baku 1000 mg/L Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/ml}$; 5 $\mu\text{g/ml}$; 10 $\mu\text{g/ml}$; 15 $\mu\text{g/ml}$; 20 $\mu\text{g/ml}$ dan 25 $\mu\text{g/ml}$ Sn.

B.5.1.3 Peralatan

- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Erlenmeyer 250 ml;
- Penangas listrik;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Spektrofotometer Serapan Atom beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- Pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi;
- Labu ukur 50 ml, 100 ml, dan 1000 ml, terkalibrasi;
- Gelas ukur kapasitas 50 ml;
- Gelas piala 250 ml;
- Penangas air.

B.5.1.4 Cara kerja

- Timbang 30 g sampai 40 g dengan teliti ke dalam Erlenmeyer 250 ml, keringkan menggunakan oven pada suhu 120 °C, tambahkan 30 ml HNO_3 pekat;
- Panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- Lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 ml sampai 6 ml atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- Angkat Erlenmeyer dari penangas listrik, tambahkan 25 ml HCl pekat, dan panaskan sampai selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl_2 berhenti;
- Tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 ml sampai 15 ml;
- Tambahkan 40 ml air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 ml, bilas Erlenmeyer tersebut dengan 10 ml air suling;
- Tambahkan 1,0 ml KCl , dinginkan pada temperatur ruang, tepatkan hingga tanda garis dengan air suling, dan saring.

- h) Siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) Baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi $N_2O-C_2H_2$;
- j) Buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu g/ml$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- k) Plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- l) Lakukan pengerjaan duplo;
- m) Hitung konsentrasi logam dalam contoh.

B.5.1.5 Perhitungan

$$\text{Konsentrasi Sn (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

dengan:

C adalah konsentrasi Sn dari kurva kalibrasi, ($\mu g/ml$);

V adalah volume larutan akhir, (ml);

m adalah bobot contoh, (g).

B.5.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 11%. Jika RSD lebih besar dari 11%, maka analisis harus diulang kembali.

B.6 Cemaran arsen (As)

B.6.1 Prinsip

Contoh di destruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As^{5+} direduksi dengan KI menjadi As^{3+} dan direaksikan dengan $NaBH_4$ atau $SnCl_2$ sehingga terbentuk AsH_3 yang kemudian dibaca dengan SSA pada panjang gelombang 193,7 nm.

B.6.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida ("HVG");
- b) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g
- c) Labu Kjeldahl 250 ml;
- d) Labu ukur 50 ml, 100 ml, 500 ml, dan 1000 ml terkalibrasi;
- e) Pemanas listrik;
- f) Pipet volumetrik 25 ml;
- g) Cawan porselen kapasitas 50 ml;
- h) Gelas ukur 25 ml;
- i) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- j) Pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi.

B.6.3 Pereaksi

- a) Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- b) Asam perklorat, $HClO_4$ pekat;
- c) Natrium boronhidrida, $NaBH_4$;
larutkan 3 g $NaBH_4$ dan 3 g $NaOH$ dengan air suling sampai tanda garis dalam labu ukur 500 ml.

- d) Asam klorida, HCl 8M;
Larutkan 66 ml HCl 37 % kedalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- e) Timah (II) klorida, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 %;
timbang 50 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam piala gelas 200 ml dan tambahkan 100 ml HCl 37 %. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- f) Kalium iodida, KI 20 %;
timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- g) Larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 75 mg/ml;
larutkan 3,75 g MgO dengan 30 ml H_2O secara hati-hati, tambahkan 10 ml HNO_3 , dinginkan dan encerkan hingga 50 ml dengan air suling;
- h) Larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ As;
larutkan 1,3203 g As_2O_3 kering dengan sedikit NaOH 20 % dan netralkan dengan HCl atau HNO_3 1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 liter dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- i) Larutan baku 100 $\mu\text{g/ml}$ As;
pipet 10 ml larutan baku arsen 1000 $\mu\text{g/ml}$ ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$ As.
- j) Larutan baku 1 $\mu\text{g/ml}$ As;
pipet 1 ml larutan baku arsen 100 mg/l ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/ml}$ As.
- k) Larutan baku kerja As;
pipet masing-masing 1,0 ml; 2,0 ml; 3,0 ml; 4,0 ml dan 5,0 ml larutan baku 1 $\mu\text{g/ml}$ As ke dalam labu ukur 100 ml terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01 $\mu\text{g/ml}$; 0,02 $\mu\text{g/ml}$; 0,03 $\mu\text{g/ml}$; 0,04 $\mu\text{g/ml}$ dan 0,05 $\mu\text{g/ml}$ As.

B.6.4 Cara kerja

B.6.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 15 g sampai 30 g contoh kedalam labu Kjeldahl 250 ml, tambahkan 5 ml sampai 10 ml HNO_3 pekat dan 4 ml sampai 8 ml H_2SO_4 pekat dengan hati-hati;
- b) Setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan HNO_3 pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- c) Tambahkan 2 ml HClO_4 70 % sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan asam perklorat, tambahkan lagi sedikit HNO_3 pekat);
- d) Dinginkan, tambahkan 15 ml air suling dan 5 ml amonium oksalat jenuh;
- e) Panaskan sehingga timbul uap SO_3 di leher labu;
- f) Dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 ml atau 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- g) Pipet 25 ml larutan diatas dan tambahkan 2 ml HCl 8 M; 0,1 ml KI 20 % kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- h) Siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) Tambahkan larutan pereduksi (NaBH_4) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- j) Baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- k) Buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/ml}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;

- l) Plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- m) Lakukan pengerjaan duplo;
- n) Hitung konsentrasi As dalam contoh;

B.6.4.2 Destruksi menggunakan *microwave* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 ml HNO₃ pekat kemudian tutup rapat.
- b) Masukkan ke dalam oven microwave dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) Setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- d) Pipet 10 ml larutan diatas ke dalam labu dasar bulat 50 ml, tambahkan 1 ml larutan Mg(NO₃)₂, panaskan menggunakan penangas listrik hingga kering kemudian abukan pada tanur dengan suhu 450 °C;
- e) Dinginkan, larutkan dengan 2 ml HCl 8 M; 0,1 ml KI 20 % dan biarkan minimal 2 menit;
- f) Siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- g) Tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- h) Baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- i) Buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/ml) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) Plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- k) Lakukan pengerjaan duplo;
- l) Hitung konsentrasi As dalam contoh.

B.6.5 Perhitungan

$$\text{Konsentrasi As (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

dengan:

C adalah konsentrasi As dari kurva kalibrasi, (µg/ml);

V adalah volume larutan akhir, (ml);

m adalah bobot contoh, (g).

B.6.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

B.7 Cemarkan mikroba

B.7.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji angka lempeng total, bakteri *coliform*, *staphylococcus aureus* dan kapang/khamir

B.7.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk menggiatkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

B.7.1.2 Larutan pengencer*Buffered Pepton Water (BPW)*

- Pepton	10 g
- Natrium klorida	5 g
- <i>Disodium hydrogen phosphate</i>	3,5 g
- <i>Kalium dihydrogen phosphate</i>	1,5 g
- Air suling	1000 ml

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1000 ml dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan larutan tersebut ke dalam botol 500 ml. Sterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 20 menit.

B.7.1.3 Peralatan

- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Gelas piala steril;
- Labu Erlenmeyer steril;
- Botol pengencer steril;
- Pipet volumetrik steril;
- Tabung reaksi;
- Alat pembuka kemasan steril;
- Pisau, sendok, gunting, dan spatula steril;
- Labu ukur 50 ml, 100 ml, 500 ml, dan 1000 ml terkalibrasi;
- Penangas listrik.

B.7.1.4 Cara kerja

- Timbang 25 g contoh dan masukkan ke dalam botol yang telah berisi 225 ml larutan pengencer sehingga diperoleh pengenceran 1:10.
- Kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

B.7.2 Angka lempeng total (metode *plate count*)**B.7.2.1 Prinsip**

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 48 jam pada suhu 35 °C ± 1 °C.

B.7.2.2 Peralatan

- Cawan petri gelas / plastik diameter 90 mm – 100 mm steril;
- Pipet ukur 1ml, 5 ml, dan 10 ml;
- Penangas air;
- Lemari pengering (inkubator);
- Alat penghitung koloni (*colony counter*);
- Autoklaf;
- Oven / alat sterilisasi kering.

B.7.2.3 Pembenihan dan pengencer

- Plate count agar (PCA)*
 - *Pancreatic digest of Caseine* 5 g
 - *Yeast extract* 2,5 g
 - Glukosa 1 g

- Agar 15 g
- Air suling 1000 ml

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1000 ml dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan 450 ml larutan tersebut ke dalam botol-botol berukuran 500 ml. Sterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

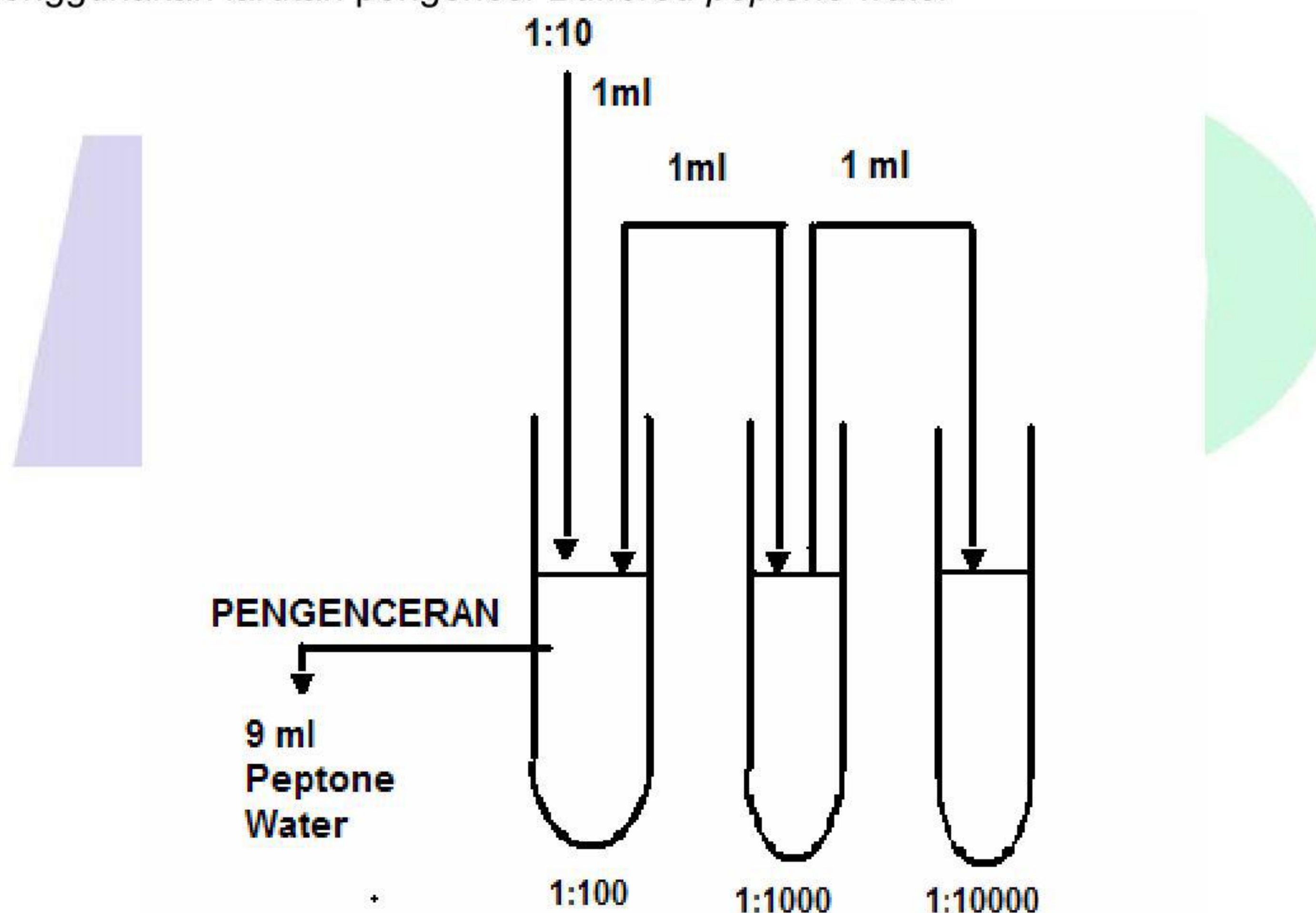
b) *Buffered peptone water* (BPW)

- Peptone 10 g
- Natrium klorida 5 g
- Disodium hidrogen fosfat 3,5 g
- Kalium dihidrogen fosfat 1,5 g
- Air suling 1000 ml

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1000 ml dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Pipet ke dalam tabung-tabung reaksi. Sterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 20 menit.

B.7.2.4 Cara kerja

- a) Buat tingkat pengenceran sesuai kebutuhan seperti pada Gambar 1 dengan menggunakan larutan pengencer *Buffered peptone water*



Gambar B.1 - Metoda pengenceran

- Pipet masing-masing 1 ml dari pengenceran 10^1 – 10^4 ke dalam cawan petri steril secara duplo;
- Tuangkan 12 ml sampai 15 ml media PCA yang masih cair dengan suhu $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ke dalam masing-masing cawan petri;
- Goyangkan cawan petri dengan hati-hati (putar dan goyang ke depan, ke belakang, ke kanan dan ke kiri) sehingga contoh dan pembedahan tercampur merata dan memadat;
- Kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer untuk setiap contoh yang diperiksa;
- Biarkan sampai campuran dalam cawan petri memadat;
- Masukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengering pada suhu $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 48 jam.

- h) Catat pertumbuhan koloni pada setiap cawan petri yang mengandung 25 koloni – 250 koloni setelah 48 jam;

B.7.2.5 Perhitungan

Angka lempeng total (koloni/g) = $n \times F$

dengan:

n adalah rata – rata koloni dari dua cawan petri dari satu pengenceran, (koloni/g);

F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

B.7.2.6 Pernyataan hasil

B.7.2.6.1 Cara menghitung

1. Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni – 250 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram.
2. Jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni – 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
120	25
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

3. Jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni – 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus :

$$ALT = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

dengan :

C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri;

n_1 adalah jumlah petri dari pengenceran pertama yang dihitung;

n_2 adalah jumlah petri dari pengenceran kedua;

d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

4. Jika jumlah koloni dari masing-masing petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan.

- a) Jika jumlah koloni per cm^2 kurang dari 100 koloni maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.
Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1000 \times 640 = 640.000 (6.4 \times 10^5)$

- b) Jika jumlah koloni per cm^2 lebih dari 100 koloni maka nyatakan hasilnya:
area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per cm^2

10^{-2}	10^{-3}	area (cm^2)	jumlah bakteri perkiraan
~	7150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6500.000 (6.5 \times 10^6)$
~	6490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5900.000 (5.9 \times 10^6)$

5. Jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan petri kurang dari 25 maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah .

6. Menghitung koloni perambat.

Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :

- a) Merupakan rantai yang tidak terpisah;
b) Perambat yang terjadi diantara dasar cawan petri dan pembenihan;
c) Perambatan yang terjadi pada pinggir atau perukuan pembenihan.

Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk satu atau lebih rantai terbentuk dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka uap sumber dihitung sebagai satu koloni.

B.7.2.6.2 Cara menghitung dan membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri),

1. Jika angka ketiga lebih besar dari 5 maka bulatkan ke atas.
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya $5,3 \times 10^2$
2. Jika angka ketiga kurang dari 5 maka bulatkan kebawah.
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya $5,2 \times 10^2$
3. Jika angka ketiga sama dengan 5 maka bulatkan sebagai berikut :
 - a) Bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil.
contohnya: 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya $5,8 \times 10^2$
 - b) Bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap
contohnya: 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya $5,6 \times 10^2$

B.7.3 Bakteri *coliform*

B.7.3.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *coliform* ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung Durham, yang diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

B.7.3.2 Peralatan

- a) Cawan petri gelas ukuran 15 mm x 100 mm atau plastik ukuran 15 mm x 90 mm, steril;
- b) Pipet Mohr 1 ml dan 10 ml berskala;

- c) Botol pengenceran (± 20 ml) gelas borosilikat yang resisten, dengan sumbat karet atau tutup uliran;
- d) Lemari pengeram (Inkubator), $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- e) Tabung reaksi dan tabung Durham;
- f) Rak untuk tabung reaksi;
- g) Jarum inokulasi (ose), dengan diameter dalam kira-kira 3 mm;
- h) Penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, $45,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

B.7.3.3 Perbenihan pengencer dan pereaksi

- a) *Lauryl sulfate tryptose (LST) broth / Lauryl tryptose (LST) broth*;
- b) *Brilliant green lactose bile (BGLB) broth 2 %*;
- c) *E. C. Broth*;
- d) *Levine's Eosin methylene blue (L-EMB) agar*;
- e) *Plate Count Agar (PCA)* dalam tabung-tabung miring ;
- f) *Gram stain*;
- g) *Tryptone (tryptophane) broth*;
- h) *Pereaksi Kovacs'*;
- i) *MR - VP broth*;
- j) *Pereaksi Voges Proskauer*;
- k) *Larutan Methyl Red*;
- l) *Koser's Citrate Medium*;
- m) *Bacto peptone Water* 9 ml dalam tabung-tabung steril;
- n) *Pereaksi Indole*;
- o) *Larutan Kalium Hidroksida 40 %*;
- p) *α -naftol*;
- q) *Kreatin*.

B.7.3.4 Cara kerja

B.7.3.4.1 Presumptive test untuk bakteri coliform (uji dugaan)

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada B.7.1.4.
- b) Inokulasikan masing-masing 1 ml larutan dari setiap tingkat pengenceran (10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}) ke dalam tiga tabung *Lauryl Tryptose Broth*. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- c) Masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama $48\text{ jam} \pm 2\text{ jam}$;
- d) Amati tabung-tabung tersebut pada jam ke- 24 jam $\pm 2\text{ jam}$ jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan "positif";
- e) Tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan "negatif", lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
- f) Catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapapun, setelah inkubasi $48\text{ jam} \pm 2\text{ jam}$, karena ini adalah *presumptive test* yang positif untuk bakteri *coliform* untuk tabung-tabung yang negatif;
- g) Lakukan *confirmed test* terhadap semua tabung yang positif untuk *presumptive test*.

B.7.3.4.2 Confirmed test untuk bakteri coliform (uji penegasan)

- a) Kocok Tabung LST yang positif secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung;
- b) Pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST yang positif ke dalam tabung BGLB 2 % yang berlainan;

- c) Masukkan tabung-tabung BGLB 2 % kedalam inkubator pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 48 jam ± 2 jam ;
- d) Catat semua tabung BGLB yang positif menghasilkan gas dan dengan menggunakan Tabel Angka Paling Mungkin (APM) Tabel B.3., tentukan APM berdasarkan jumlah tabung BGLB yang memperlihatkan pembentukan gas dalam jumlah berapapun, selama 48 jam ± 2 jam pada $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- e) Laporkan sebagai APM bakteri *coliform* per gram.

Tabel B.3 APM per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1; 0,01; dan 0,001 g contoh

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	<3	2	2	0	21
0	0	1	3	2	2	1	28
0	1	0	3	2	2	2	35
0	1	1	6	2	3	0	29
0	2	0	6	2	3	1	36
0	3	0	9	3	0	0	23
1	0	0	4	3	0	1	39
1	0	1	7	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	10	3	2	2	216
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1100
2	1	2	27	3	3	3	>1100

B.7.4 *Staphylococcus aureus* (Metode plate count)

B.7.4.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada perbenihan khusus setelah diinkubasi pada suhu 35°C selama 45 jam sampai 48 jam dan dilanjutkan dengan uji koagulase.

B.7.4.2 Peralatan

- a) Spreader steril;
- b) Botol pengencer 500 ml;
- c) Tabung reaksi;
- d) Gelas ukur 10 ml;
- e) Cawan petri;
- f) Gelas sediaan;
- g) Inkubator 35°C ;
- h) Pipet ukur;

- i) Jarum ose/inokulasi.

B.7.4.3 Perbenihan dan pereaksi

- Baird parker* agar;
- Brain heart infusion broth* (BHIB);
- Plasma kelinci.

B.7.4.4 Cara kerja

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada B.7.1.4
- Pipet masing-masing 0,3 ml; 0,3 ml dan 0,4 ml larutan contoh dari setiap seri pengenceran kedalam masing-masing 3 cawan petri yang berisi media BPA.
- sebar contoh secara merata dengan menggunakan spreader steril. Tahan cawan pada posisi tegak lurus sampai contoh terserap oleh medium (+10 menit). Apabila contoh tidak mudah diserap oleh medium, tempatkan cawan petri pada posisi tegak lurus didalam inkubator selama 1 jam sebelum cawan petri dibalik;
- Inkubasikan pada suhu 35 °C selama 45 jam sampai 48 jam;
- Pilih cawan petri yang mengandung 20 koloni sampai 200 koloni dan hitung tersangka koloni *S. aureus* dengan ciri yaitu koloni berbentuk bulat, licin, basah, berdiameter 2 mm sampai 3 mm, berwarna abu-abu sampai hitam mengkilat dengan lingkaran buram di sekelilingnya dan seringkali lingkaran jernih. Koloni mempunyai getah kental ketika disentuh dengan jarum inokulasi

B.7.4.5 Uji koagulase

- Pindahkan koloni tersangka ke dalam tabung berisi 0,2 ml sampai 0,3 ml *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB);
- Inkubasikan pada suhu 35 °C selama 18 jam sampai 24 jam;
- Tambahkan koagulase plasma kelinci sebanyak 0,5 ml ke dalam kultur BHIB dan campurkan keduanya;
- Inkubasikan campuran plasma kelinci dengan biakan BHIB pada suhu 35 °C selama 18 jam sampai 24 jam dan memeriksanya setelah 6 jam akan terbentuk penggumpalan. Hanya bentuk yang kokoh dan sempurna serta dapat bertahan didalam wadahnya ketika tabung dibalikkan disebut sebagai positif *S. aureus*;
- Rata-ratakan koloni dari ketiga cawan petri yang diwakili oleh koloni-koloni yang memberikan reaksi penggumpalan dan dikalikan dengan faktor pengencerannya.

B.7.4.6 Perhitungan

Angka *Staphylococcus aureus* (koloni/gr) = $n \times F$

dengan:

n adalah jumlah rata-rata koloni dari 3 cawan petri;

F adalah faktor pengenceran.

B.7.5 *Clostridium* sp.

B.7.5.1 Prinsip

Pertumbuhan *Clostridium* sp. yang dapat mereduksi sulfit pada media selektif yang dicirikan oleh terbentuknya koloni berwarna hitam.

B.7.5.2 Perbenihan, pengencer dan pereaksi

- a) *Peptone water*;
- b) *TSC Agar (Tryptose Sulfite Cycloserine)*;
- c) *Egg Yolk Emulsion*.

B.7.5.3 Peralatan

- a) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- b) Pipet 1ml dan 10 ml terkalibrasi;
- c) Alat penghitung koloni;
- d) Blender;
- e) *Anaerobic Jar*;
- f) Tabung reaksi,
- g) Cawan petri;
- h) Inkubator terkalibrasi.

B.7.5.4 Cara kerja

- a) Timbang 50 g contoh ke dalam blender yang steril secara aseptik. Tambahkan 450 ml *peptone water* dan homogenisasikan selama 2 menit pada kecepatan rendah (13000 rpm);
- b) Buat tingkat pengenceran 10^{-2} sampai 10^{-6} menggunakan larutan pengencer *peptone water*. Contoh: untuk 10^{-2} : pindahkan 10 ml pengenceran 10^{-1} ke dalam 90 ml *pepton water*;
- c) Tuang masing-masing 5 ml TSC Agar ke dalam 10 cawan petri, sebarkan dengan cepat dan ratakan;
- d) Pada saat agar telah membeku, pipet secara aseptik 1 ml contoh yang telah homogen dari masing-masing pengenceran secara duplo pada bagian tengah cawan petri;
- e) Tuangkan kembali 15 ml TSC Agar tanpa *egg yolk* ke dalam petri. Campur dengan baik dan putar dengan hati-hati;
- f) Atau dengan cara lain, dengan menggunakan tangkai penyebar, sebarkan 0,1 ml contoh di atas cawan petri yang berisi medium TSC Agar yang mengandung *egg yolk* ;
- g) Biarkan medium terserap oleh contoh 5 menit sampai 10 menit, kemudian lapisi dengan 10 ml TSC agar lagi, tanpa *egg yolk*;
- h) Pada saat agar telah membeku, tempatkan cawan petri didalam anaerobik jar. Kondisi diusahakan anaerobik dan diinkubasi pada suhu 35 °C selama 20 jam untuk TSC Agar tanpa *egg yolk* dan 35 °C selama 24 jam untuk TSC Agar dengan *egg yolk*;
- i) Setelah inkubasi selesai, pindahkan cawan petri dari jar dan amati secara visual untuk pertumbuhan dan adanya koloni berwarna hitam;
- j) Pilih cawan petri yang menunjukkan perkiraan 20 koloni sampai 200 koloni hitam, dan hitung jumlah *Clostridium sp.*/ g contoh;

B.7.5.5 Perhitungan

B.7.6 Kapang/khamir

B.7.6.1 Prinsip

Pertumbuhan kapang/khamir dalam media yang sesuai, setelah diinkubasikan pada suhu 25 °C ± 1 °C selama 5 hari.

B.7.6.2 Pembenihan dan pengencer

- a) *Peptone dilution fluid* atau *pepton water*
- b) PDA (*Potato Dextrose Agar*) atau pembenihan yang lainnya (*Mycophil*, *Malt Extract Agar*) yang ditambah dengan antibiotik klorotetrasiklin atau kloramfenikol atau streptomisin (250 ml pembenihan ditambah dengan 1 ml larutan 1 g antibiotik dalam 100 ml air suling steril)
- c) PDA (*Potato Dextrose Agar*)
 - *Infusion from white potatoes* 200 g
 - *Dextrose* 20 g
 - *Agar* 15 g
 - *Air suling* 1 liter

Larutkan semua bahan. Masukkan dalam labu, sterilkan pada 121 °C selama 15 menit. Sebelum dipergunakan dinginkan sampai 50 °C dan pH diatur 3,5 dengan asam tartrat 10 % steril. Penurunan pH dapat diganti dengan penambahan 4 ml antibiotik (1g/100ml). Campurkan, kemudian tuangkan ke dalam pinggan petri.

B.7.6.3 Peralatan

- a) Cawan petri (100 x 15 mm);
- b) Pipet ukur 1 ml dan 10 ml;
- c) Penangas air 45 °C ± 1 °C;
- d) Lemari pengeringan 25 °C atau suhu kamar;
- e) Alat penghitung koloni;
- f) Mikroskop.

B.7.6.4 Cara kerja

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti B.7.1.4.
- b) Pipet 1 ml dari masing-masing pengenceran $10^1 - 10^2$ ke dalam cawan petri steril secara duplo. Tuangkan PDA yang telah dicairkan atau perbenihan lainnya (suhu 45 °C ± 1 °C) sebanyak 15 ml – 20 ml ke dalam cawan petri dan goyangkan cawan petri sedemikian rupa sehingga campuran tersebar merata.
- c) Setelah pembenihan membeku, inkubasikan pada suhu 25 °C ± 1 °C selama 5 hari (tanpa dibalik)
- d) Hitung koloni kapang/khamir (dapat dilakukan mulai hari ke tiga sampai ke lima)
- e) Laporkan atau catat hasil sebagai jumlah kapang/khamir dalam satuan koloni/g contoh

B.7.6.5 Pernyataan hasil

Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 10 koloni – 150 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri dengan menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah kapang/khamir dalam satuan koloni/g.

CATATAN 1 Koloni kapang biasanya buram dan berbulu

CATATAN 2 Koloni khamir berwarna putih dan licin (berbau asam)

CATATAN 3 Tegaskan koloni dengan pemeriksaan di bawah mikroskop sehingga yakin bahwa koloni tersebut adalah kapang / khamir.

Bibliografi

CODEX Alimentarius Commission. 1996. Codex Standard for Jams (Fruit Preservatives) and Jellies. CODEX STAN 79-1981.

CODEX Alimentarius Commission. 1996. FAO/WHO Codex Alimentarius Sampling Plans for Prepackaged Foods (AQL-6.5). CAC/RM 42-1969

Association of Official Analytical Chemistry. 2000. AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method, 17th Edition, Chapter 9.1.01.

Association of Official Analytical Chemistry. 2000. AOAC Official Method 985.16, Tin in Canned Food, Atomic Absorption Spectrophotometric Method, 17th edition, Chapter 9.2.35.

Association of Official Analytical Chemistry. 2000. AOAC Official Method 966.23, Microbiological Methods, 17th Edition, Chapter 17.2.01.

International Organization for Standardization. 2003. Fruit and Vegetable Products. Determination of Soluble Solids – Refractometer. ISO 2173: 2003 (E).

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 1998. Aerobic Plate Count. 8th edition. Chapter 3.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 1998. Escherichia coli and Coliform Bacteria. 8th edition. Chapter 4.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 1998. Staphylococcus aureus. 8th edition. Chapter 12.

Association of Official Analytical Chemistry. 2000. AOAC Official Method 976.30, Clostridium perfringens, Microbiological Method, Method, 17th edition. Chapter 17.7.02.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 1998. Mold, Yeast and Mycotoxin. 8th edition. Chapter 18.





BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.or.id